

DOI:10.13350/j.cjpb.220902

• 论著 •

基于免疫信息学技术的结核分枝杆菌多表位疫苗构建*

曹钰婷, 吴雪晗, 宁钰, 孟祥英, 乔晋娟**

(潍坊医学院医学检验学院, 山东潍坊 261053)

【摘要】 目的 筛选具有抗原表位可能性的结核分枝杆菌高活性结合肽(HABPs), 构建基于 HABPs 的多表位疫苗。

方法 通过免疫信息学方法预测 HABPs 的保护性抗原可能性、细胞毒性、致敏性及潜在 B 细胞和 T 细胞表位; 将筛选出的 HABPs 与佐剂霍乱毒素 B 亚单位连接, 构建多表位疫苗, 并对其二级结构和理化性质进行分析; 采用 I-TASSER 服务器进行多表位疫苗三级结构同源建模, 优化的模型质量通过 PROCHECK、ERRAT 及 ProSA-web 软件进行验证; 使用 PatchDock 软件进行多表位疫苗与 TLR-4 的分子对接; 对疫苗进行密码子优化、在线克隆和免疫模拟。 **结果** 共筛选出 32 条 HABPs 序列, 构建的多表位疫苗包含 881 个氨基酸残基, 二级结构由 43.93% 的 α 螺旋、13.62% 的 β 折叠和 42.45% 的无规则卷曲组成, 不稳定性指数(II)、脂肪族指数和亲水性平均值分别为 45.34、84.09 和 -0.009, 表明该疫苗具有灵活、稳定的球形构象和亲水结构。Ramachandran 图中位于核心区域和允许区的氨基酸比例大于 90%, ERRAT 评估整体质量因子值为 74.39, Z 值为 -5.94, 表明 3D 模型的质量整体较好。分子对接结果表明疫苗可与 TLR-4 稳定相互作用。经过密码子优化的疫苗可在大肠埃希菌中高效表达。免疫模拟显示, 当反复暴露于多表位疫苗抗原时, 机体的 B 细胞和 T 细胞免疫反应均得到增强。此外, 多表位疫苗还可诱导高水平细胞因子的分泌。 **结论** 利用免疫信息学工具构建的基于 HABPs 的多表位疫苗含有 B、T 细胞表位, 有望同时激发机体体液免疫和细胞免疫, 具有良好应用前景, 但其实际免疫效果还需进一步证实。

【关键词】 结核分枝杆菌; 免疫信息学; 疫苗; 表位

【中图分类号】 R373.911

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)09-0999-06

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Sep.; 17(9): 999-1004.]

Designing a multi-epitope vaccine against *Mycobacterium tuberculosis* by immunoinformatics approach

CAO Yu-ting, WU Xue-han, NING Yu, MENG Xiang-ying, QIAO Jin-juan (Department of Medical Laboratory Science, Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong, China)***

【Abstract】 **Objective** To screen potential epitopes from the highly active binding peptides (HABPs) of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) and construct a multi-epitope vaccine based on HABPs. **Methods** The immunogenicity, toxicity, allergenicity and potential B- and T- cell epitopes of HABPs were predicted by immunoinformatics approach. A multi-epitope vaccine was constructed by connecting the selected HABPs with the adjuvant, cholera toxin B subunit. Then the secondary structure and physicochemical properties of the construct were analyzed. The tertiary structure of vaccine protein was predicted using an online I-TASSER server, and the structural quality of the refined model was verified by PROCHECK, ERRAT and ProSA-web software. The designed multi-epitope vaccine protein was submitted to PatchDock server for molecular docking with TLR4. Finally, codon optimization, in silico cloning and immune simulation of the vaccine were carried out. **Results** In this study, 32 HABPs were selected to construct the multi-epitope vaccine, which contained 881 amino acid residues. The secondary structure was composed of 43.93% helix, 13.62% beta-strand, and 42.45% coil. The average values of instability index (II), aliphatic index and grand average of hydropathicity were 45.34, 84.09 and -0.009, respectively, indicating that the vaccine has a flexible and stable spherical conformation and a hydrophilic structure. Ramachandran plot showed that more than 90% residues of the multi-epitope vaccine lay in the favoured and additional allowed region, the overall quality factor evaluated by ERRAT is 74.39, and the Z score is -5.94, indicating that the model of the vaccine construct was reliable. A stable interaction of the vaccine with TLR-4 was confirmed by molecular docking. The codon-optimized vaccine could be efficiently expressed in *Escherichia coli*. The immune simulation showed that the second and third immunization stimulated a stronger immune response than the primary immunization. In addition, the multi-epitope vaccine could induce the secretion of high-level cytokines. **Conclusion** In this study, a multi-epitope vaccine based on HABPs was constructed by immunoinformatics tools. The designed vaccine is expected

* **【基金项目】** 山东省自然科学基金项目(No. ZR2020MH305); 山东省医药卫生科技发展计划项目(No. 2019WS593); 国家级大学生创新创业训练计划项目(No. 202110438065)。

** **【通讯作者】** 乔晋娟, E-mail: qiaojj234@126.com

【作者简介】 曹钰婷(2002-), 女, 甘肃庆阳人, 本科(医学检验技术专业)在读。E-mail: caoyuting0428@163.com

to trigger both humoral and cellular immune responses and would be a promising vaccine candidate against Mtb infection. However, the exact safety and immunogenicity profile of this vaccine needs to be verified experimentally.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; immunoinformatics; vaccine; epitope

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb) 感染引起结核病^[1]。卡介苗是目前唯一被批准使用的抗 Mtb 疫苗,但对成人的保护效果差异较大。导致卡介苗对成人效果不佳的一个重要原因是部分人群预先接触了普遍存在于环境中的其他分枝杆菌^[2]。此外,卡介苗是一种 Mtb 的减毒株,存在毒力逆转的可能性,这种潜在危害对免疫抑制人群是致命的^[3]。因此,亟需开发安全、高效的新型结核病疫苗。在位于 Mtb 表面的蛋白中存在一类能与肺泡上皮细胞或单核巨噬细胞高效结合的多肽,称为高活性结合肽 (High activity binding peptides, HABPs), HABPs 在 Mtb 入侵宿主的过程中发挥重要作用,可作为新型抗

结核疫苗的靶点。本研究拟通过免疫信息学方法筛选无细胞毒性和致敏性,且能激活体液免疫和细胞免疫的 HABPs,构建基于 HABPs 的多表位疫苗,分析多表位疫苗的二级结构及理化性质,并通过 3D 结构模型预测和验证、分子对接和免疫模拟评估疫苗的结构、热稳定性和免疫效率。

材料与方法

1 材料

HABPs 为 Mtb 来源的经实验验证能与肺泡上皮细胞或单核巨噬细胞结合的多肽, HABPs 序列及其相关信息如表 1。

表 1 HABPs 的 B 细胞、HTL 和 CTL 表位预测
Table 1 B-cell, HTL and CTL epitope prediction of HABPs

表位 Epitopes	来源蛋白 Protein	ABCpred 预测值 ABCpred score	等位基因 Allele	半抑制浓度 IC ₅₀	超型 Supertype
TGMAALEQYLGS GHAVIVS ^[4]	Rv1268c	0.74	HLA-DQA1 * 05:01/DQB1 * 03:01	76	A2
LIGIPVAALIHVY TYRKLSSG ^[5]	Rv2560	0.66	HLA-DRB5 * 01:01	49	A3; B7
VGFGPDYQTGG ALLAWLTAA ^[6]	Rv1510c	0.92	HLA-DQA1 * 05:01/DQB1 * 03:01	121	A2
TLTRAPLLVPLS AMQGNLIAY ^[7]	Rv1510c	0.52	HLA-DRB1 * 07:01	178	A2; B7
GVRRGTDLMYL ALVMAFSFT ^[8]	Rv3632	0.59	HLA-DRB1 * 07:01	207	A3; B7
TLSTYMRFKDL ELRYARIA ^[8]	Rv3632	0.61	HLA-DRB1 * 01:01	243	A2; A3
IDALVGAGLDR KDIRTTRVTY ^[9]	Rv3623	0.85	HLA-DRB1 * 09:01	268	
YAGAGRRQR RRRSGDGQWRLRQ ^[10]	PE9	0.89	HLA-DRB1 * 11:01	175	
YGTGVFR RRRRGRQIVTAAEHR ^[10]	PE9	0.84	HLA-DRB1 * 11:01	168	A3; B7
LSVMAIFYLRL PATFGIGTY ^[11]	Rv3494c	0.55	HLA-DRB1 * 11:01	170	A2; A3
GANNKIAFDR IDERLVVGLY ^[6]	Rv0679c	0.72	HLA-DRB1 * 11:01	475	A2
YKNGDPTIDN LGAGNRINKE ^[6]	Rv0679c	0.77	HLA-DQA1 * 05:01/DQB1 * 03:01	644	
AEILVKYAQL ADKRARVYVL ^[6]	RV1490	0.72	HLA-DRB5 * 01:01	541	A2
YVSAVPV RTFFAELRGNLAL ^[6]	RV1490	0.66	HLA-DRB5 * 01:01	121	B7
GATRRICTAL AIGPGTVSVLY ^[6]	RV1490	0.8	HLA-DQA1 * 05:01/DQB1 * 03:01	79	A2; B7
PEIEQP PSRRNVQVFCVVLY ^[6]	RV1490	0.79	HLA-DRB5 * 01:01	1440	A3
ATAAPKTY TEELKGTDTGQA ^[6]	Rv1980c	0.86	HLA-DQA1 * 05:01/DQB1 * 03:01	1062	B7
CQIQMSD PAYNINISLPSY ^[6]	Rv1980c	0.85	HLA-DRB1 * 11:01	225	A2; A3
GVAELVGAQ VISTDDVRRRL ^[6]	Rv2004c	0.56	HLA-DQA1 * 05:01/DQB1 * 03:01	111	
AHLSDP SGGHAEPVVMMRRY ^[6]	Rv2004c	0.72	HLA-DQA1 * 05:01/DQB1 * 03:01	120	
ILDSASNQ HYSSRAAAAAYC ^[6]	Rv2969c	0.76	HLA-DQA1 * 05:01/DQB1 * 03:01	63	A3
ATVVAG SSGSKPSGGPLPDY ^[12]	Rv1411c	0.79	HLA-DQA1 * 05:01/DQB1 * 03:01	92	A3
TTNPTA ATGNVKLTLGGSDIY ^[12]	Rv1411c	0.59	HLA-DQA1 * 05:01/DQB1 * 03:01	265	B7
IAPGS GSTADGQTPAGGHSVY ^[12]	Rv1911c	0.74	HLA-DQA1 * 05:01/DQB1 * 03:01	106	B7
LVVALG GCGGGGDSRETPPY ^[12]	Rv1911c	0.92	HLA-DQA1 * 05:01/DQB1 * 03:01	110	
GANVAP PLTWSSPAGAAELAY ^[12]	Rv1911c	0.63	HLA-DQA1 * 05:01/DQB1 * 03:01	78	B7
YVPKAT TVDATTPAPAAEPL ^[12]	Rv1911c	0.81	HLA-DQA1 * 05:01/DQB1 * 03:01	260	B7
CSSNGAR GGIASSTNMNPTNPY ^[12]	Rv2270	0.82	HLA-DQA1 * 05:01/DQB1 * 03:01	26	
TASPGA AASGPKVVIDGKDQNY ^[12]	Rv3763	0.84	HLA-DQA1 * 05:01/DQB1 * 03:01	59	
LITSRR QRKSAPARISGDRI ^[13]	Rv3166c	0.61	HLA-DRB1 * 11:01	307	A3
ESPAPS ARSESLARAAEIGLY ^[13]	Rv3166c	0.84	HLA-DQA1 * 05:01/DQB1 * 03:01	231	B7
DVFSAV RADDSPTGEMQVAQY ^[14]	Rv2536	0.81	HLA-DQA1 * 05:01/DQB1 * 03:01	816	B7

注:黑体部分为 HABPs 中包含的潜在 CTL 表位序列。

2 方法

2.1 HABPs 抗原表位可能性分析 将 HABPs 序列分别提交至 VaxiJen v2.0、ToxinPred 和 AllerTOP v.2.0 软件,在线预期其保护性抗原可能性、细胞毒性和致敏性。其中,VaxiJen v2.0 的阈值设为 0.4,预测值超过 0.4 的为可能的保护性抗原。从可能的保护性抗原中挑选无细胞毒性且无致敏性的 HABPs 序列,用于进一步分析。

通过在线 ABCpred 软件预测选定 HABPs 序列作为 B 细胞表位的可能性,阈值设为 0.51,预测值超过 0.51 的即为潜在的 B 细胞抗原表位。通过 IEDB 软件的 MHC-II Binding Predictions 模块预测选定 HABPs 序列作为辅助 T 细胞(helper T cell, HTL)表位的可能性,方法选用 IEDB recommended 2.22,等位基因选择 HLA-DQA1 * 05:01/DQB1 * 03:01、HLA-DRB1 * 07:01、HLA-DQA1 * 01:02/DQB1 * 06:02、HLA-DRB1 * 03:01、HLA-DQA1 * 05:01/DQB1 * 03:01、HLA-DRB1 * 11:01、HLA-DRB5 * 01:01,预测不同等位基因的 IC₅₀ 值;使用 IFNepitope 软件预测不同表位诱导机体产生 IFN- γ 的能力;通过 NetCTL 1.2 预测选定 HABPs 序列作为细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T cell, CTL)表位的可能性,Supertype 选择 A2、A3 和 B7,C-末端蛋白酶裂解、TAP 转运效率和表位识别阈值分别设置为 0.15、0.15 和 0.75。

2.2 多表位疫苗的构建及其二级结构和理化性质分析 将不同的 HABPs 序列用 AAY 连接肽连接,并在 N 端用 EAAAK 连接肽连接作为佐剂的霍乱毒素 B 亚单位(1-124 位氨基酸)序列,然后利用 PSIPRED 和 ProtParam 工具分别对构建的多表位疫苗序列进行二级结构和理化性质分析。

2.3 同源建模与分子对接 多表位疫苗三级结构的同源建模采用全自动 I-TASSER 蛋白质建模服务器,将得分最高的模型通过 ModeRefiner 和 GalaxyRefine 软件进行两步优化。优化后的模型质量通过 SAVES v6.0 软件的 PROCHECK 和 ERRAT 模块及 ProSA-web 软件进行验证。多表位疫苗与 TLR-4(PDB ID: 3FXD)的分子对接通过 PatchDock 软件进行,Clustering RMSD 设置为 4.0。将候选模型根据 geometric shape complementarity 评分进行排序,并将排名前 10 的模型提交至 FireDock 软件进行进一步优化。

2.4 在线疫苗构建及克隆分析 Java 密码子适应工具(JCat)被用于多表位疫苗密码子优化,物种选择大肠埃希菌 K-12 菌株。通过 SnapGene Viewer 软件将优化的多表位疫苗核酸序列插入 pET-28a(+)载体。

2.5 免疫模拟 为了表征所设计的多表位疫苗的免疫应答谱和免疫原性,通过 C-IMMSIM 软件对多表位

疫苗进行免疫模拟。模拟体积和模拟步骤分别设定为 10 和 540,随机种子默认为 12345。免疫程序共包含 3 次注射,注射时间步长分别设置为 1、84 和 252(一个时间步长约为 8h),整个模拟运行 540 个时间步长,约为 6 个月。

结果

1 HABPs 抗原表位综合分析

共筛选出 32 条 HABPs 序列,如表 1 所示。这些序列均经过 VaxiJen v2.0、ToxinPred、AllerTOP v.2.0 和 IFNepitope 软件分析,VaxiJen v2.0 预测值均大于 0.4,表明其具备保护性抗原可能性,同时这些 HABPs 均具备诱导机体产生 IFN- γ 的能力,且无细胞毒性和致敏性。通过 ABCpred 软件预测 HABPs 是否为潜在的 B 细胞表位,所有多肽 ABCpred 预测值均超过阈值,其中有 12 条 HABPs 预测值大于 0.8。有 24 条 HABPs 同时含有 CTL 和 HTL 表位,表明这些 HABPs 不仅能激活体液免疫,同时能激活 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞。

2 多表位疫苗的二级结构和理化性质

最终的疫苗蛋白包含 881 个氨基酸残基。PSIPRED 生成了多表位疫苗蛋白的二级结构,该结构由 43.93%的 α 螺旋、13.62%的 β 折叠和 42.45%的无规则卷曲组成(图 1)。多表位疫苗的理化性质通过 ExPASy 工具的 ProtParam 模块进行预测,理论分子质量为 93.76 ku,理论 pI 为 9.28,不稳定性指数(II)为 45.34,提示其可能为不稳定蛋白;脂肪族指数为 84.09,亲水性平均值为 -0.009(<0),表明其亲水性较好。

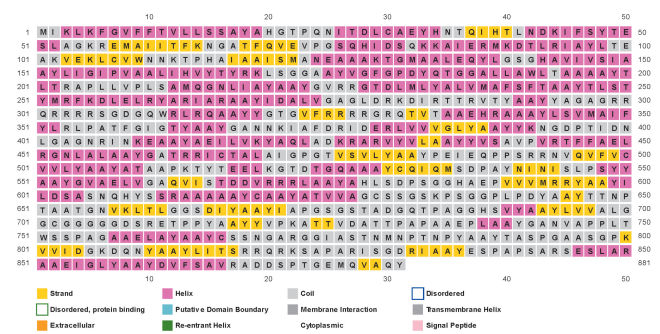


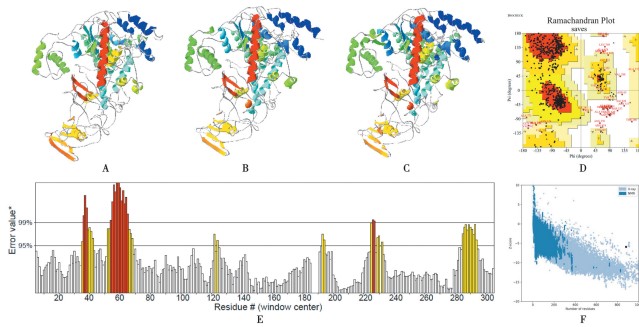
图 1 PSIPRED 预测的疫苗二级结构

Fig. 1 Secondary structure predictions of vaccine construct using PSIPRED

3 多表位疫苗的 3D 模型预测及验证

使用 I-TASSER 服务器预测多表位疫苗蛋白的 3D 模型,在预测的前 5 个最终模型中选择 C 值为 -1.68、TM 预测值为 0.51 \pm 0.15、RMSD 预测值为 12.8 \pm 4.2 \AA 的模型(图 2A)进行优化。图 2B 显示的

是 ModeRefiner 优化后的模型, RMSD 值为 1.602, TM 值为 0.9787 (TM 值大于 0.5 表明模型具有正确的拓扑结构)。通过 GalaxyRefine 服务器对模型进一步优化, 得到最终的模型结构 (图 2C)。通过 PROCHECK、ERRAT 及 ProSA-web 对模型质量进行评价。PROCHECK 输出的 Ramachandran 图显示, 多表位疫苗中 81.1% 的氨基酸残基位于核心区域, 13.4% 位于允许区, 2.5% 位于大致允许区, 3.0% 位于不允许区 (图 2D), 位于核心区域和允许区的氨基酸比例大于 90%, 提示该疫苗 3D 模型构象合理。ERRAT 评估得到的整体质量因子值为 74.39 (图 2E), ProSA-web 软件评估 Z 值为 -5.94 (图 2F), 表明优化的 3D 模型质量整体较好。



A I-TASSER 同源建模获得的多表位疫苗 3D 模型 B ModeRefiner 优化后的模型 C GalaxyRefine 优化后的模型结构 D 优化后模型结构的 Ramachandran 图 E 优化后模型结构的 ERRAT F 优化后模型结构的 Z 得分

图 2 蛋白建模、模型优化和评价

A The final 3D model of the multi-epitope vaccine obtained after homology modeling on I-TASSER B The refined model obtained via ModeRefiner C The refined 3D structure by GalaxyRefine D Validation of the refined model with Ramachandran plot E ERRAT F Z-score

Fig. 2 Protein modelling, refinement and validation

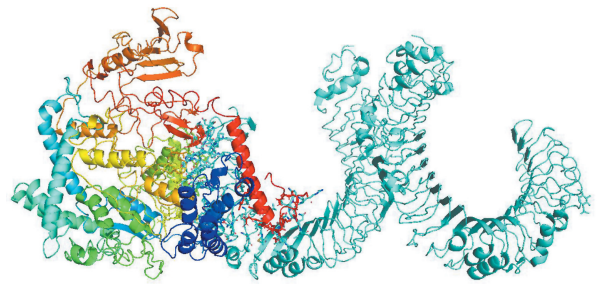
4 多表位疫苗与 TLR-4 的分子对接

使用 PatchDock 服务器进行多表位疫苗与 TLR-4 (PDB ID 3FXI) 的分子对接, 共得到 1 644 个对接方案。根据几何分数、原子接触能、界面面积大小和实际刚性转换排名, 然后将排名前 10 的对接方案提交到 FireDock 服务器进行进一步完善。选择具有最低全局能量 (-11.28 kJ/mol) 的对接方案作为最终分子对接结果 (图 3)。

5 多表位疫苗的密码子优化和在线克隆

为了使多表位疫苗蛋白在大肠埃希菌原核表达系统中最大限度地表达, 采用 JCat 软件对多表位疫苗进行密码子优化。优化后的核酸序列包含 2 643 个核苷酸, GC 含量为 50.73%, CAI 值为 1.00 (图 4A)。通常认为, CAI 值大于 0.8 且 GC 含量在 30% 至 70% 之间时蛋白表达水平良好^[15]。利用 SnapGene 软件将优化的多表位疫苗编码序列插入到原核表达质粒

pET28a (+) 中进行重组表达载体的在线克隆, 结果如图 4B 所示。



注: 多表位疫苗标记为彩虹色; TLR-4 标记为青色。

图 3 多表位疫苗与 TLR-4 的分子对接

Notes: Docked complexes for vaccine-TLR-4 complex with vaccine colored rainbow color and TLR-4 colored cyan.

Fig. 3 Molecular docking of the multi-epitope vaccine protein with TLR-4

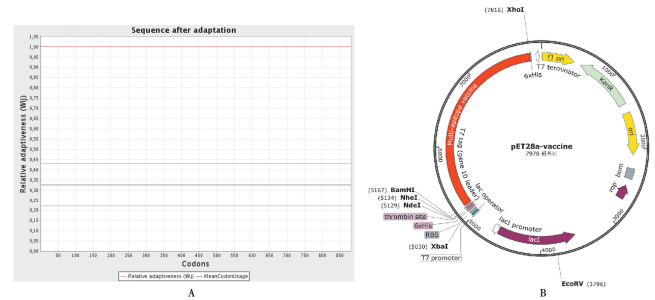


图 4 优化密码子的相对适应性 (A) 和 pET28a-多表位疫苗蛋白重组表达载体图谱 (B)

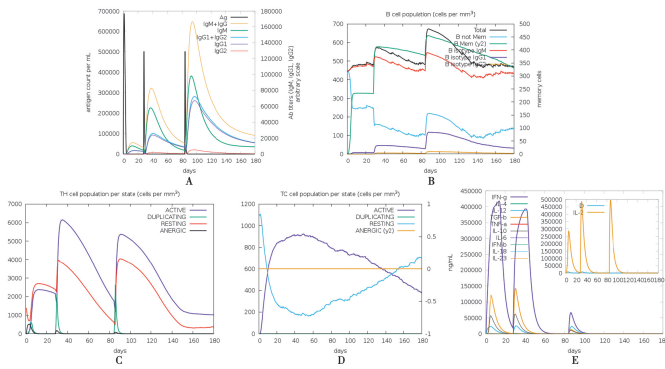
Fig. 4 The relative adaptiveness of the adapted codon (A) and the map of recombinant expression vector pET28a-multi-epitope vaccine protein (B)

6 多表位疫苗的免疫模拟

多表位疫苗的免疫模拟结果如图 5 所示。第 2 次和第 3 次免疫比第 1 次免疫激发了更强的免疫反应 (图 5)。在第 2 次和第 3 次免疫后, 抗体 (IgG1 + IgG2、IgM、IgG + IgM、IgG1) 滴度, 尤其是 IgM 滴度显著增加, 产生的主要 IgG 类型为 IgG1 (图 5A), 不同类型的记忆 B 细胞增加, 非记忆 B 细胞减少 (图 5B)。活性 HTL 和 CTL 也在第 2 次和第 3 次免疫后显著增加 (图 5C 和 5D)。多表位疫苗还可诱导高水平的 IFN-γ 和 IL-2 细胞因子分泌 (图 5F)。

讨论

目前结核病仍是对全球公共卫生影响最大的疾病之一, 而卡介苗已被证明在保护成年人免受肺结核感染方面无效, 开发新的抗结核疫苗对于结核病的防控具有重要意义。Mtb 是一种胞内寄生菌, 主要感染肺泡巨噬细胞, 与宿主细胞的结合是 Mtb 感染机体的关键环节。来源于 Mtb 表面膜蛋白的 HABPs 能与宿主细胞高效结合, 可作为结核疫苗的候选抗原, 用于阻断靶细胞受体和分枝杆菌之间的特异性相互作用^[9]。



注:以上分别为每次注射后免疫球蛋白(按同型细分)的滴度(A);注射抗原后每个状态下B细胞(B)、辅助性T细胞(C)和细胞毒性T细胞(D)种群的演变(静息状态代表未提呈抗原的细胞,而无能状态代表T细胞因反复暴露而产生对抗原的耐受性);注射后细胞因子和白细胞介素的浓度(E),插图显示的是IL-2水平与辛普森指数D。

图5 多表位疫苗的C-IMMSIM免疫模拟

Notes: Immunoglobulin (sub-divided per isotype) production in response to antigen injections (A). The evolution of B-cell (B), T-helper (C) and T-cytotoxic cell (D) populations per state after the injections. The resting state represents cells not presented with the antigen while the anergic state characterizes tolerance of the T-cells to the antigen due to repeated exposures. (E) Concentration of cytokines and interleukins after the injections, and the insert plot shows IL-2 level with the Simpson index D.

Fig. 5 Immune simulation results of the multi-epitope vaccine by C-IMMSIM server

Mtb为胞内寄生菌,可在被感染的巨噬细胞内复制。因此,细胞免疫在抗结核免疫应答中发挥重要作用^[16]。研究发现,B细胞和抗体不仅参与抗结核体液免疫,还通过调节宿主的各种免疫成分增强宿主对Mtb的细胞免疫应答^[17]。因此,理想的抗Mtb疫苗应同时包含T细胞和B细胞抗原表位。此外,为了获得最大的疗效,同时尽可能降低疫苗不良反应,所选HABPs应具有免疫保护性,且无毒性 and 致敏性。本研究通过免疫信息学方法对文献中报道的HABPs进行分析,共筛选出来源于17个Mtb蛋白的32条HABPs序列。筛选出的HABPs均具有免疫保护性和诱导机体产生IFN- γ 的能力,且无细胞毒性和致敏性。此外,预测所有HABPs均具有潜在的B细胞表位和T细胞表位,其中有24条HABPs同时含有CTL和HTL表位。因此,由这些选定的HABPs组成的多表位疫苗应该是安全的,且可刺激机体产生体液免疫和细胞免疫应答。

理化性质及结构对于多表位疫苗的设计是不可或缺的。本研究构建的多表位疫苗预期分子质量为93.76 ku,表明其具有良好的免疫原性。通过ExPASy的ProtParam模块预测包括不稳定性指数、脂肪族指数和亲水性在内的各种理化性质,结果表明该疫苗结构稳定,亲水性好,但脂肪族指数略高,提示其可能存在热不稳定性。多表位疫苗蛋白的二级结构中

包含13.62%的 β 折叠和42.45%的无规则卷曲,表明疫苗具有灵活的构象。PROCHECK、ERRAT及ProSA-web等模型质量评价显示,经过2次优化的多表位疫苗3D模型整体质量较好。

为了进一步提高疫苗的免疫原性,本研究将霍乱毒素B亚单位(cholera toxin subunit B, CTB)作为佐剂添加到了多表位疫苗的N末端。TLR-4高表达于人骨髓来源的细胞,如单核细胞、巨噬细胞和未成熟树突状细胞,因此,TLR-4配体激动剂具有强大的免疫刺激作用,已被用作亚单位疫苗的佐剂^[18]。CTB是TLR-4的高效激动剂,CTB和TLR-4之间的直接相互作用促进CTB对TLR-4的激活,CTB能够通过直接结合诱导TLR-4受体细胞中NF- κ B的激活^[19]。因此,本研究利用CTB作为佐剂构建的多表位疫苗与TLR-4进行了分子对接。多表位疫苗和TLR-4之间最佳对接复合物的总能量为-11.28 kJ/mol,表明设计的多表位疫苗与TLR-4具有良好的结合能力,并可能引发保护性免疫反应。

本研究设计的多表位疫苗序列主要来源于病原菌,无需翻译后修饰,因此可通过原核表达系统大量制备。大肠埃希菌培养成本低、易于操作,是最常用的原核表达系统。为了确保设计的多表位疫苗能在大肠埃希菌中高效表达,通过JCat软件对多表位疫苗进行密码子优化,最终优化的DNA序列GC含量为50.73%,CAI值为1.00,表明多表位疫苗在大肠埃希菌中高效表达的可能性。

通过免疫模拟预测了设计的多表位疫苗的免疫效果。结果表明,当反复暴露于多表位疫苗抗原时,B细胞、HTL和CTL免疫反应均得到增强,这与本研究设计的多表位疫苗中所选HABPs都含有B细胞和CTL或HTL表位是一致的,说明该疫苗可同时有效激活体液免疫和细胞免疫。此外,多表位疫苗还可诱导高水平的细胞因子,特别是IFN- γ 的分泌,这也与筛选的每条HABP都具备诱导机体产生IFN- γ 的能力的预期一致。

本研究利用免疫信息学工具构建了一种基于HABPs的多表位疫苗,该疫苗所选HABPs含有潜在CTL、HTL和B细胞表位,具有抗原性,且无细胞毒性和致敏性。对二级结构和理化性质的预测表明,该多表位疫苗具有灵活、稳定的球形构象和稳定的亲水结构。ERRAT和ProSA web服务器验证了3D模型的结构质量,分子对接证实了疫苗与TLR-4的稳定相互作用。此外,密码子优化和在线克隆预测了该疫苗在大肠埃希菌中的高效表达可能性,免疫模拟表明该疫苗能够激发有效的体液免疫和细胞免疫。表明构建的HABPs的多表位疫苗是一种具有良好应用前景的抗结核疫苗,但其实际免疫效果还需进行实验证实。

【参考文献】

- [1] 刘静,吴芳,张杰,等. 结核分枝杆菌 Rv1733c 蛋白的生物信息学分析[J]. 中国病原生物学杂志,2021,16(3):274-281.
- [2] Brandt L,Feino Cunha J,Weinreich Olsen A,et al. Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine;some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis [J]. Infect Immun,2002,70(2):672-678.
- [3] Hesseling AC,Marais BJ,Gie RP,et al. The risk of disseminated Bacille Calmette-Guerin (BCG) disease in HIV-infected children [J]. Vaccine,2007,25(1):14-18.
- [4] Ocampo M,Rodríguez DC,Rodríguez J,et al. Rv1268c protein peptide inhibiting *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv entry to target cells [J]. Bioorg Med Chem,2013,21(21):6650-6656.
- [5] Plaza DF,Curtidor H,Patarroyo MA,et al. The *Mycobacterium tuberculosis* membrane protein Rv2560—biochemical and functional studies [J]. FEBS J,2007,274(24):6352-6364.
- [6] Ocampo M,Patarroyo MA, Vanegas M, et al. Functional, biochemical and 3D studies of *Mycobacterium tuberculosis* protein peptides for an effective anti-tuberculosis vaccine [J]. Crit Rev Microbiol,2014,40(2):117-145.
- [7] Vera-Bravo R, Torres E,Valbuena JJ,et al. Characterising *Mycobacterium tuberculosis* Rv1510c protein and determining its sequences that specifically bind to two target cell lines [J]. Biochem Biophys Res Commun,2005,332(3):771-781.
- [8] Sanchez-Barinas CD,Ocampo M,Tabares L,et al. Specific binding peptides from Rv3632;a strategy for blocking *Mycobacterium tuberculosis* entry to target cells? [J]. Biomed Res Int, 2019 (2019):8680935.
- [9] Sanchez-Barinas CD,Ocampo M, Vanegas M,et al. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv LpqG protein peptides can inhibit mycobacterial entry through specific interactions [J]. Molecules,2018,23(3):526.
- [10] Diaz DP,Ocampo M,Pabon L,et al. *Mycobacterium tuberculosis* PE9 protein has high activity binding peptides which inhibit target cell invasion [J]. Int J Biol Macromol,2016(86):646-655.
- [11] Rodriguez DC,Ocampo M,Varela Y,et al. Mce4F *Mycobacterium tuberculosis* protein peptides can inhibit invasion of human cell lines [J]. Pathog Dis,2015,73(3):ftu020.
- [12] Ocampo M,Curtidor H, Vanegas M, et al. Specific interaction between *Mycobacterium tuberculosis* lipoprotein-derived peptides and target cells inhibits mycobacterial entry in vitro [J]. Chem Biol Drug Des,2014,84(6):626-641.
- [13] Ocampo M, Aristizabal-Ramirez D, Rodríguez DM, et al. The role of *Mycobacterium tuberculosis* Rv3166c protein-derived high-activity binding peptides in inhibiting invasion of human cell lines [J]. Protein Eng Des Sel,2012,25(5):235-242.
- [14] García J,Puentes A,Rodríguez L,et al. *Mycobacterium tuberculosis* Rv2536 protein implicated in specific binding to human cell lines [J]. Protein Sci,2005,14(9):2236-2245.
- [15] Grote A,Hiller K,Scheer M,et al. JCat;a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host [J]. Nucleic Acids Res,2005,33(Web Server issue):W526-531.
- [16] Carabali-Isajar ML,Ocampo M,Rodríguez DC, et al. Towards designing a synthetic antituberculosis vaccine:The Rv3587c peptide inhibits mycobacterial entry to host cells [J]. Bioorg Med Chem,2018,26(9):2401-2409.
- [17] Chapeton-Montes JA,Plaza DF,Barrero CA,et al. Quantitative flow cytometric monitoring of invasion of epithelial cells by *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Front Biosci,2008(13):650-656.
- [18] Agarwal S,Ghosh S,Sharma S,et al. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv expresses differential proteome during intracellular survival within alveolar epithelial cells compared with macrophages [J]. Pathog Dis,2018,76(6):fty058.
- [19] Phongsisay V,Iizasa E,Hara H,et al. Evidence for TLR-4 and FcγR3 activation by cholera toxin B subunit and its direct bindings to TREM2 and LMIR5 receptors [J]. Mol Immunol,2015,66(2):463-471.
- 【收稿日期】 2022-04-10 【修回日期】 2022-07-01
-
- (上接 998 页)
- [16] Altamirano-Lagos MJ,Diaz FE,Mansilla MA,et al. Current animal models for understanding the pathology caused by the respiratory syncytial virus[J]. Front Microbiol,2019(10):873.
- [17] Russell CD,Unger SA,Walton M,et al. The human immune response to Respiratory Syncytial Virus infection[J]. Clin Microbiol Rev,2017,30(2):481-502.
- [18] Ye Q,Shao WX,Shang SQ,et al. Epidemiological characteristics and immune status of children with Respiratory Syncytial Virus [J]. J Med Virol,2015,87(2):323-329.
- [19] van Benten IJ,van Drunen CM,Koopman LP,et al. RSV-induced bronchiolitis but not upper respiratory tract infection is accompanied by an increased nasal IL-18 response[J]. J Med Virol,2003,71(2):290-297.
- [20] Walsh EE,Peterson DR,Kalkanoglu AE,et al. Viral shedding and immune responses to respiratory syncytial virus infection in older adults[J]. J Infect Dis,2013,207(9):1424-1432.
- [21] D'Alessio FR. Mouse models of acute lung injury and ARDS[J]. Methods Mol Biol,2018(1809):341-350.
- 【收稿日期】 2022-04-24 【修回日期】 2022-07-07